

明細書

癌細胞増殖抑制ヒトモノクローナル抗体の取得法

技術分野

- 5 本発明は、たとえば、ヒトの疾患の治療、診断、予防などの医学および薬学分野や、生化学試薬、生体高分子の精製試薬などの薬理学・生化学分野などの広い分野において有用な癌細胞増殖抑制活性を有するヒトモノクローナル抗体またはその断片の取得またはスクリーニング方法に関する。

10 背景技術

- 癌細胞は正常細胞とは質的・量的に異なった癌特異抗原あるいは癌関連抗原を有しており、ある場合には、そのような抗原をもつ癌細胞は宿主の免疫系によって排除されると考えられる。ヒトの場合、初期の研究において癌患者の血清中に自己の癌細胞と反応する抗体の存在が確認されたことから、そのような抗体を大量に且つ安定に供給することが可能であれば、癌の治療・診断において極めて利用価値の高いものになると考えられた。しかし、癌患者の血清中には、1) 多種多様な特異性をもつ抗体が含まれており、自己の癌細胞と反応する抗体を単離することは困難であること、2) そのような抗体は量的に制限があること、3) 安定供給が得られないこと、などの問題点があった。

- 20 KohlerとMilsteinによって開発されたハイブリドーマ法によるモノクローナル抗体の作製技術はこれらの問題点を解決するものであった。彼らの報告以後、ヒト癌細胞あるいはその抽出物でマウスを免疫し、ヒト癌細胞と反応する多数のマウスモノクローナル抗体がつくられ、それらが認識する抗原の同定とともに、一部の抗体は臨床応用も試みられた。

- 25 しかしながら、そのような臨床試験の結果から明らかになった問題点は、ヒトにとって異種であるマウス由来の抗体をヒトに頻回投与した場合、HAMA反応(Human Anti-Mouse Antibody response: ヒト抗マウス抗体反応)が誘導され、その結果、副作用ならびに治療効果の減弱を引き起こすことであった。そこで、より安全性の高い同種由来の抗癌抗体、すなわちヒト抗癌モノク

ローナル抗体の出現が要望された。

このような状況下に、本発明者らは、特公平1-59878号公報、特公平7-121221号公報、特公平7-119240号公報、特許第2599258号公報、特許第2509191号公報、特公平8-29078号公報、特公平7-98000号公報、特許第2721817号公報、特許第2830976号公報、特開昭62-70400号公報、特開平06-141884号公報、特開平09-100300号公報に詳しく開示されているごとく、癌患者リンパ球とヒトB細胞リンパ芽球との細胞融合により種々のヒト-ヒトハイブリドーマを創製し、癌細胞と結合性を有するヒトモノクローナル抗体を多数取得した。本発明者らは、それら抗体に関しさらに研究を行なったところ、ヒトモノクローナル抗体の癌細胞結合活性と抗癌効果（細胞増殖抑制効果）との間には明確な相関が存在しないこと、すなわち、癌と結合する抗体のすべてが必ずしも抗癌効果を示すものではないことが判明した。癌細胞に結合する抗体の特異性は非常に多様であるので、それらすべてにおいて抗癌効果を調べることは、
10 実際上不可能である。

15

発明の開示

本発明の主たる目的は、癌細胞と結合する多数のヒトモノクローナル抗体の中から、抗癌効果を示す抗体を選別（スクリーニング）・取得することができる簡便な方法を、
15 提供することである。

20 そこで、本発明者らは、上記の如き課題を解決すべく、以下のような研究を行った。

本発明者らは、先に、子宮癌患者リンパ球とヒトB細胞リンパ芽球との細胞融合により、ヒト癌細胞に高い反応性を有するヒトモノクローナル抗体を産生するヒト-ヒトハイブリドーマ細胞株CLNH11（ATCC HB8307）を樹立した。そして、CLNH11が産生するモノクローナル抗体CLN-IgGが子宮癌のみならず
25 脳腫瘍、肺癌、胃癌、大腸癌などの多くの種類の癌と結合し、さらには癌細胞の増殖を抑制することを明らかにした。さらに、本発明者らは、CLN-IgGが認識する抗原は細胞骨格蛋白質の一種であるヒトビメンチンであることを明らかにした（Hagiwara et al. Human Antibodies 10, 77-82（2001））。また、ヒトビメンチンの各種断片を作製し、それぞれの断片とC

LN-I g Gの結合性を調べ、CLN-I g Gによって認識される抗原エピトープ領域を同定したところ、ヒトビメンチンのロッドC2ドメイン上のアミノ酸残基番号289～367からなる領域にエピトープが存在することが判明した（特開2002-51785公報参照）。

- 5 癌細胞増殖抑制効果を期待して抗体を作製する場合、これまでは、細胞増殖関連蛋白質（たとえば、細胞膜上の細胞増殖因子受容体や細胞増殖因子など）や、特に癌細胞で過剰に発現している細胞表面蛋白質などを標的抗原として用いるのが通例であった。したがって、細胞骨格蛋白質であるヒトビメンチンが癌抗原として機能し、なおかつ、抗体による細胞増殖抑制効果の標的となりうることはこれまで全く知られて
- 10 おらず、ましてや、ヒトビメンチンを標的とした抗癌ヒトモノクローナル抗体は皆無であった。

- そこで、本発明者らは、ヒト癌細胞と反応する種々のヒトモノクローナル抗体の特異性と抗腫瘍効果との関連性を調べた。その結果、今回、ヒトビメンチンの特定のエ
- 15 ピトープに結合性を有する抗体は癌細胞増殖抑制活性を持ち、他方、結合性を有しない抗体は癌細胞増殖抑制活性を実質的に示さないことを究明し、ヒトビメンチン又は少なくともヒトビメンチンのアミノ酸配列残基番号246～372の領域を含むヒトビメンチン断片と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又はその断片を選択することによって、癌細胞の破壊または増殖抑制効果を有するヒトモノクローナル抗体又はその断片を選択・取得することができることを見出し、本発明を完成するに
- 20 至った。

- かくして、本発明によれば、ヒトモノクローナル抗体又はその断片をヒトビメンチン又は少なくともヒトビメンチンのアミノ酸配列残基番号246～372の領域を含むヒトビメンチン断片と接触させ、ヒトビメンチンのアミノ酸配列のアミノ酸残基
- 25 番号246～372の領域と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又はその断片を選択することを特徴とする癌細胞増殖抑制活性を有するヒトモノクローナル抗体又はその断片の取得またはスクリーニング方法が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、ウェスタンブロッティングでみたヒトモノクローナル抗体とヒト膠芽種細胞

胞株U-251MGのビメンチンとの結合性を示すチャートである。図1において、

- 1 : 分子量マーカー
- 2 : CLN-IgG
- 3 : TOH/G2-IgG
- 5 4 : IM9-IgG
- 5 : HT2-IgM

図中、右側に示した矢印はヒトビメンチンの位置を表す。

図2は、ウェスタンブロッティングでみたヒトモノクローナル抗体とビメンチン断片-GST融合蛋白質との結合性を示すチャートである。図2において、

10 A. CLN-IgGを用いたウェスタンブロッティング

- 1 : 分子量マーカー
- 2 : GST
- 3 : ヒトビメンチンC2ドメイン (アミノ酸残基番号246~397) - GST融合蛋白質
- 15 4 : ヒトビメンチンC2断片 (アミノ酸残基番号246~367) - GST融合蛋白質
- 5 : ヒトビメンチンC2断片 (アミノ酸残基番号246~372) - GST融合蛋白質
- 6 : ヒトビメンチンC2断片 (アミノ酸残基番号289~367) - GST融合蛋白質
- 20 7 : ヒトビメンチンC2断片 (アミノ酸残基番号246~371) - GST融合蛋白質
- 8 : ヒトビメンチンC2断片 (アミノ酸残基番号246~372) - GST融合蛋白質
- 25 9 : ヒトビメンチンC2断片 (アミノ酸残基番号289~371) - GST融合蛋白質
- 10 : ヒトビメンチンC2断片 (アミノ酸残基番号289~372) - GST融合蛋白質
- 11 : 分子量マーカー

B. HT-2 IgMを用いたウェスタンブロッティング

レーン1～6はCBB染色、レーン7～12はウェスタンブロッティング

- 1 : 分子量マーカー
- 5 2 : ヒトビメンチンC1ドメイン (アミノ酸残基番号96～245) - GST融合蛋白質
- 3 : ヒトビメンチンC2ドメイン (アミノ酸残基番号246～397) - GST融合蛋白質
- 10 4 : ヒトビメンチンC2断片 (アミノ酸残基番号246～372) - GST融合蛋白質
- 5 : BSA (ウシ血清アルブミン)
- 6 : ヒト膠芽腫U-251 MG細胞抽出液
- 7 : 分子量マーカー
- 15 8 : ヒトビメンチンC1ドメイン (アミノ酸残基番号96～245) - GST融合蛋白質
- 9 : ヒトビメンチンC2ドメイン (アミノ酸残基番号246～397) - GST融合蛋白質
- 10 : ヒトビメンチンC2断片 (アミノ酸残基番号246～372) - GST融合蛋白質
- 20 11 : BSA (ウシ血清アルブミン)
- 12 : ヒト膠芽腫U-251 MG細胞抽出液

図3は、ヌードマウス移植癌 (ヒト子宮頸部癌細胞株ME-180) に対する各種ヒトモノクローナル抗体の細胞増殖抑制効果を示すグラフである。

- : PBS
- 25 ■ : TOH/G2-IgG
- : IM9-IgG
- ▲ : CLN-IgG

以下、本発明によって提供される方法についてさらに詳細に説明する。

発明の詳細な記述

ヒトビメンチンは、細胞の構造を維持する働きをする細胞骨格蛋白質のうち、中間径フィラメントに分類される蛋白質（アミノ酸残基数466、分子量53,651）である。ヒトビメンチンは、N末端側からhead、coil 1（C1）、coil 1 2（C2）、tailの4つのドメイン構造を有し、特にC1およびC2は螺旋状の構造を有している。

このうち、C2ドメイン上にヒトモノクローナル抗体CLN-IgGによって認識されるエピトープが存在する。そこで、本発明者らは、このエピトープ領域をさらに絞り込むために、種々のC2断片をコードするDNAを大腸菌発現ベクターに組込み、GST（グルタチオンSトランスフェラーゼ）との融合蛋白質として発現させ精製した後、ウェスタンブロッティングおよびELISA法を用いて、それら断片とモノクローナル抗体との結合性を調べた。その結果、2種類のモノクローナル抗体がビメンチンのアミノ酸残基289～367の断片と結合することが明らかとなった（特開2002-51785公報参照）。

つぎに、各種ヒトモノクローナル抗体の癌細胞増殖抑制活性を調べるために、ヌードマウスを用いてin vivo試験を行った。まず、ヒトモノクローナル抗体と子宮頸部癌細胞株ME-180を混合し、ヌードマウスの皮下に移植した後、腫瘍体積を経時的に測定し、細胞増殖抑制効果を評価した。その結果、上述したようなヒトビメンチンエピトープと結合性を示した抗体のみに強い細胞増殖抑制効果が認められた。

これらのことより、ヒトモノクローナル抗体において、ヒトビメンチンのC2ドメイン上のエピトープ領域に対する結合性と癌細胞増殖抑制効果との間には密接な関連があることが示された。したがって、該ヒトビメンチンエピトープを用いることによって、癌細胞増殖抑制効果を示すヒトモノクローナル抗体を容易に選択・取得することが可能となる。

ヒトモノクローナル抗体CLN-IgGによって認識されるヒトビメンチンのC2ドメイン上のエピトープ領域について、本発明者らは、先に、ヒトビメンチンのC2ドメインの各種ペプチド断片を作製し、それぞれの断片とCLN-IgGとの反応

性から、CLN-I g Gによって認識される抗原エピトープ領域を同定し、その領域のアミノ酸配列を解析し、その領域がヒトビメンチンのアミノ酸配列のアミノ酸残基番号289～367の部分に相当することを明らかにした（特開2002-51785公報参照）。

- 5 本発明者らは、ヒトモノクローナル抗体CLN-I g Gによって認識されるヒトビメンチンのC2ドメイン上のエピトープ領域について、その三次元構造も含めてさらに検討を重ねた結果、CLN-I g Gによって認識される抗原エピトープ領域は、ヒトビメンチンのアミノ酸配列残基289～367の部分よりも、さらに広い領域を認識している可能性があることがわかり、その領域のアミノ酸配列を解析し、下記のア

10 ミノ酸配列：

Gln Ala Gln Ile Gln Glu Gln His Val Gln Ile Asp Val Asp Val Ser
246 250 260

Lys Pro Asp Leu Thr Ala Ala Leu Arg Asp Val Arg Gln Gln Tyr Glu
270

- 15 Ser Val Ala Ala Lys Asn Leu Gln Glu Ala Glu Glu Trp Tyr Lys Ser
280 290

Lys Phe Ala Asp Leu Ser Glu Ala Ala Asn Arg Asn Asn Asp Ala Leu
300

- 20 Arg Gln Ala Lys Gln Glu Ser Thr Glu Tyr Arg Arg Gln Val Gln Ser
310 320

Leu Thr Cys Glu Val Asp Ala Leu Lys Gly Thr Asn Glu Ser Leu Glu
330 340

Arg Gln Met Arg Glu Met Glu Glu Asn Phe Ala Val Glu Ala Ala Asn
350

- 25 Tyr Gln Asp Thr Ile Gly Arg Leu Gln Asp Glu Ile Gln Asn Met
360 370 372

で示されるヒトビメンチンのアミノ酸配列残基番号246～372の部分を決めた（配列表の配列番号6）。

上記のアミノ酸配列残基246～372の領域を含むヒトビメンチン断片（以下、「ヒトビメンチンエピトープ断片」ということがある）は種々の方法で製造することが可能である。たとえば、ヒトビメンチンエピトープ断片は、それ自体既知の固相または液相合成法によって化学的に合成することができる。また、ヒトビメンチンエピトープ断片のアミノ酸配列からそれをコードするDNAを合成し、それを細菌、動物細胞、植物細胞などの宿主とそれに対する発現ベクターからなるベクター-宿主細胞系に適用して遺伝子工学的に製造することも可能である。この場合、種々の機能を有する融合蛋白質の形態で発現させることもできる。

ヒトビメンチンエピトープ断片は、CLN-IgGと結合するものであれば、その大きさは特に制限はなく、また、CLN-IgGとの結合性が損なわれない範囲で、アミノ酸配列の一部が欠失、置換および／又は追加されているものも包含する。

他方、本発明の方法において、ヒトビメンチンとしては、ヒトビメンチンを発現しているヒト細胞、例えばヒト膠芽腫細胞株U-251 MGそのものを使用することができ、或いは該細胞から通常の蛋白質精製法に従い、例えばアフィニティクロマトグラフィー等の手段により分離される粗製の又は精製されたヒトビメンチンを使用することもできる。

ヒトビメンチン又はヒトビメンチンエピトープ断片を用いて、癌細胞増殖抑制活性を有するヒトモノクローナル抗体又はその断片（以下、便宜上「ヒトモノクローナル抗体」と総称することがある）を選別・取得する方法としては、例えば、ヒトビメンチン又はヒトビメンチンエピトープ断片を適当な固体担体（例えば、マイクロプレート、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、ガラスビーズ、樹脂、センサーチップ等）上に付着固定し、被検ヒトモノクローナル抗体又はその断片を含む液体と接触させ、担体上のヒトビメンチン又はヒトビメンチンエピトープ断片と結合するヒトモノクローナル抗体又はその断片を、酵素抗体法を利用するウェスタンブロッティング法、ELISA法、ドットブロッティング法；表面プラズモン共鳴を利用する測定法等によって検出することからなる方法が挙げられる。

かくして、ヒトビメンチンのアミノ酸配列のアミノ酸残基番号246～372の領域と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又はその断片を選択・取得することができる。

なお、上記の被検ヒトモノクローナル抗体としては、精製されたヒトモノクローナル抗体のみならず、ヒトモノクローナル抗体を産生している細胞そのものを使用することもできる。

5 以上に述べた本発明の方法により検出され又は取得されるヒトモノクローナル抗体又はその断片は、その抗体の由来に応じて各種の癌細胞の増殖を抑制する効果を有しており、癌細胞増殖抑制剤の有効成分として、例えば、子宮癌、肺癌、胃癌、大腸癌、脳腫瘍、肝癌、乳癌、前立腺癌などの癌疾患の処置のために使用することが期待される。

10 本発明により検出され又は取得されるヒトモノクローナル抗体又はその断片を癌細胞増殖抑制剤として臨床的に使用する場合、該ヒトモノクローナル抗体又はその断片は、それ自体既知の方法で、例えば、適当な賦形剤と共に凍結乾燥粉末の形態に製剤化することができ、得られる製剤は注射用蒸留水で復元した後、非経口的に、例えば静脈内、腫瘍内に投与することができる。

15 実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれらによって何ら制限されるものではない。

20 実施例1：ヒトビメンチンに結合するヒトモノクローナル抗体のウェスタンブロッティング法による選択

ヒト膠芽腫細胞株U-251 MG (ヒューマンサイエンス財団 IFO50288) を62.5 mMトリス (pH6.8)、2% SDS、5% 2-メルカプトエタノール、4 M尿素を含む溶液中で超音波破碎し、細胞 5×10^4 個に相当する破碎液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にかけた。

25 電気泳動後、セミドライ型のブロッティング装置を用いて48 mMトリス、39 mMグリシン、0.037% SDS、10%メタノール中でHybond ECL膜 (アマシャムファルマシアバイオテク社製) に蛋白質を転写した。

つぎに、転写後の膜をブロッキング溶液 (5%スキムミルク含有PBS-T (0.3% Tween 20を含有するリン酸緩衝生理食塩水)) に3.7℃で1時間浸した後、

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の一次抗体(1%スキムミルク含有PBS-Tに溶解したCLN-IgG、TOH/G2-IgG、IM9-IgG又はHT2-IgM)に、37℃で30分間浸した。

さらに、膜をPBS-Tで3回洗った後、二次抗体(1%スキムミルク含有PBS-Tで溶解したペルオキシダーゼ標識アフィニティ精製ヤギ抗ヒトIgG抗体又は
5 ペルオキシダーゼ標識アフィニティ精製ヤギ抗ヒトIgM抗体(いずれもBIOSOURCE社製、1万倍希釈))に37℃で30分間浸した。PBS-Tで3回洗った後、ECL detection reagent(アマシャムファルマシアバイオテク社製)を添加し、1分間静置した(ECL detection reagentは、
10 膜上に固定された蛋白質の中から、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いて、目的の抗原を化学発光によって検出する高感度システムである)。

最後に、膜からDetection reagentを除去し、膜をOHPシートにはさみX線フィルムに1分間露光した後、フィルムを現像した。

その結果、図1に示すとおり、被検ヒトモノクローナル抗体4種のうち、CLN-IgGとHT2-IgMの2種がヒトビメンチンを認識していることが判明した(図
15 1で矢印はビメンチンの位置を表す)。

実施例2：ヒトビメンチンC2断片-GST融合蛋白質の作製

ヒトビメンチンのアミノ酸配列をもとに配列表に示す配列番号1、2、3の3'側のDNAプライマーおよび配列番号4、5の5'側のDNAプライマーを合成し、これらのプライマーを種々組み合わせて、ヒトビメンチンC2ドメインを含むプラスミドを鋳型にPCRを行い、C2ドメインの種々部分配列を増幅した。得られた断片をEcoRIおよびNotIで消化した後、DNAライゲーションキット・バージョン2(宝酒造社製)を用いて、EcoRIおよびNotIで消化したGST融合蛋白質
25 発現ベクターpGEX-4T-1(アマシャムファルマシアバイオテク社製)に連結した。さらに、大腸菌BL21(アマシャムバイオサイエンス社製)を得られたプラスミドで形質転換し、アンピシリン耐性株を選択し、それらからアルカリ法でプラスミドを調製した。得られたプラスミドをEcoRIおよびNotIで消化した後、アガロース電気泳動にかけ、ヒトビメンチンC2の断片が挿入されているクローンを確

認し選択した。

- 上記で得られた各組換えプラスミドを有する大腸菌クローンを2 mLのLB培地
(バクトトリプトン10 g/L、バクトイーストエキストラクト5 g/L、塩化ナト
リウム10 g/L)に植え、25℃で一晩培養した。この培養液を再び20 mLのL
5 B培地に植え、25℃で3.5時間培養した後、1MのIPTG (イソプロピルーβ
-D-チオガラクトピラノシド)を2 μL加えてさらに2時間培養した。5,000
rpmで5分間遠心して集菌し、上清を捨て、沈殿に1 mLのPBS (フォスフェー
トバッファードセーライン、生理食塩水 (pH 7.2))を加えた。菌体を懸濁した
溶液を超音波処理し、20% Triton X-100を1 mL加えた後、4℃で1
10 時間振盪し、グルタチオンセファロース4B (ファルマシア社製)によるアフィニテ
ィクロマトグラフィーで精製し、ヒトビメンチンC2断片-GST融合蛋白を得た。

実施例3.: ヒトビメンチンC2断片に結合するヒトモノクローナル抗体のウェスタン
ブロッティング法による選択

- 15 実施例1で得られた各融合蛋白質を200 ng/レーンの濃度に調整し、SDS-
PAGEを行った。泳動後のゲルからセミドライ・ブロッティング法によりHyb o
n d-ECL膜 (アマシャムファルマシアバイオテク社製)に蛋白質を転写した。転
写後の膜をブロッキング溶液 (5% スkimミルク含有 PBS-T)に37℃で1時
間浸した後、一次抗体 (1% スkimミルク含有PBS-Tで溶解したCLN-I g
20 GまたはHT2-I gM (それぞれ10 μg/mL))に37℃で30分間浸した。
PBS-Tで3回洗った後、二次抗体溶液 (1% スkimミルク含有PBS-Tで溶
解したペルオキシダーゼ標識アフィニティ精製ヤギ抗ヒトI g G抗体又はペルオキ
シダーゼ標識アフィニティ精製ヤギ抗ヒトI g M抗体 (いずれもBIOSORCE社
製、25,000倍希釈))に37℃で30分間浸した。PBS-Tで3回洗った後、
25 ECL detection reagent (アマシャムファルマシアバイオテク
社製)を添加し1分間静置した。さらに、膜からDetection reagen
tを除去し、膜をOHPシートにはさみX線フィルムに1分間露光した後、フィルム
を現像した。その結果を図2に示す。なお、図2Bにおいては、融合蛋白質の他に参
照として、ウシ血清アルブミンを200 ng/レーンの濃度で、また、膠芽腫細胞株

U-251MGの細胞抽出液(8M尿素、2%SDS、4%DTT、0.125M Tris-HCl pH6.8で細胞を破碎した溶液)を10 μ g蛋白/レーンの濃度で電気泳動にかけた。

その結果、CLN-IgG(図2A)とHT2-IgM抗体(図2B)のいずれも
5 ヒトビメンチン(アミノ酸残基番号246~397)と反応すること、特にヒトビメンチンC2エピトープ断片(アミノ酸残基番号246~372)と強く反応することが判明した。このことから、CLN-IgGおよびHT2-IgMはヒトビメンチンのアミノ酸残基番号246~372からなる領域を認識することが明らかとなった。

10 実施例4:ヌードマウス移植癌に対する細胞増殖抑制効果

ヒト子宮頸部癌ME-180細胞株(ATCC HTB33)5 \times 10⁶個をヒトモノクローナル抗体(CLN-IgG(ATCC HB8307)、TOH/G2-IgG又はIM9-IgG(ATCC CCL159))170 μ gと混合した後、
ヌードマウス(日本クレア、BALB/cA JCl-nu nu/nu 6週齢雌、
15 1群5匹)の皮下へ移植し、経時的に腫瘍体積を測定した。腫瘍体積は(長径) \times (短径)² \times 1/2の近似式により求めた。

その結果、ヒトビメンチン又はヒトビメンチンエピトープと結合性を有しないIM9-IgGおよびTOH/G2-IgGでは癌細胞増殖抑制効果はほとんど認められなかったが、ヒトビメンチン又はヒトビメンチンエピトープと結合性を有している
20 CLN-IgGは強い癌細胞増殖抑制効果を示した(図3)。

実施例5: *in vitro*における癌細胞増殖抑制試験

10%ウシ胎児血清(FBS)を含有するDF培地に5 \times 10⁴/mLの濃度で懸濁したヒト膠芽種細胞株U251MGを100 μ Lずつ96ウェルマイクロプレート(ヌンク社製)にまき、そこへHT2-IgM又はIM9-IgG(ATCC CCL159))を最終濃度が50 μ g/mLまたは100 μ g/mLになるように添加した。さらに、炭酸ガス濃度5%、37 $^{\circ}$ Cの条件で2日間培養した後、Cell proliferation ELISA試薬(ベーリンガー・マンハイム社製)を用いてS期の細胞によるBrdUの取り込みを測定した。具体的には、ウェルあたり

10 μ LのBrdU (100 μ M)を加え、2時間培養し、細胞の固定とDNAの変性を行った後、ペルオキシダーゼ標識抗BrdU抗体と90分間反応させ、最後に酵素基質テトラメチルベンジジン (TMB) を添加し370nmの吸光度を測定した。抗体を添加しない細胞のみの対照群と比較し、細胞増殖抑制活性を求めた。

- 5 結果は下表 (表1) に示すとおりであり、HT2-IgMでは癌細胞増殖抑制効果が認められたが、IM9-IgGでは認められなかった。すなわち、ヒトビメンチンエピトープ断片との結合性を有しているHT2-IgM抗体は増殖抑制活性を示し、他方、結合性を有していないIM9-IgG抗体は増殖抑制効果を示さなかったことから、該エピトープ断片に対する反応性の有無を調べることにより、細胞増殖抑制効
- 10 果をもつ抗体を選別・取得することが可能となる。

表1：ヒトモノクローナル抗体によるin vitro癌細胞増殖抑制効果

ヒトモノクロ ーナル抗体	濃度 (μ g/mL)	細胞増殖抑制活性 (%) ^a
HT2-IgM	50	28.7
	100	38.4
IM9-IgG	50	-1.4
	100	-20.0

- a. ヒトモノクローナル抗体を添加しなかった細胞のみの群を対照
としたときの増殖抑制活性。

請求の範囲

1. ヒトモノクローナル抗体又はその断片をヒトビメンチン又は少なくともヒトビメンチンのアミノ酸配列残基番号246～372の領域を含むヒトビメンチン断片と接触させ、ヒトビメンチンのアミノ酸配列のアミノ酸残基番号246～372の領域と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又はその断片を選択することを特徴とする癌細胞増殖抑制活性を有するヒトモノクローナル抗体又はその断片の取得又はスクリーニング方法。
2. 請求の範囲第1項に記載の方法により得られるヒトモノクローナル抗体。
- 10 3. 請求の範囲第1項に記載の方法により得られるヒトモノクローナル抗体由来の、ヒトビメンチンのアミノ酸配列のアミノ酸残基番号246～372の領域と特異的に結合する断片。
4. ヒトビメンチンのアミノ酸配列のアミノ酸残基番号246～372の領域と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又はその断片を有効成分として含有することを特徴とする癌細胞増殖抑制剤。
- 15 5. ヒトビメンチンのアミノ酸配列のアミノ酸残基番号246～372の領域と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又はその断片及び製薬学的に許容しうる担体を含んでなる薬剤組成物。
6. ヒトビメンチンのアミノ酸配列のアミノ酸残基番号246～372の領域と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又はその断片を投与することを特徴とする癌細胞の増殖抑制方法。
- 20

Fig. 1

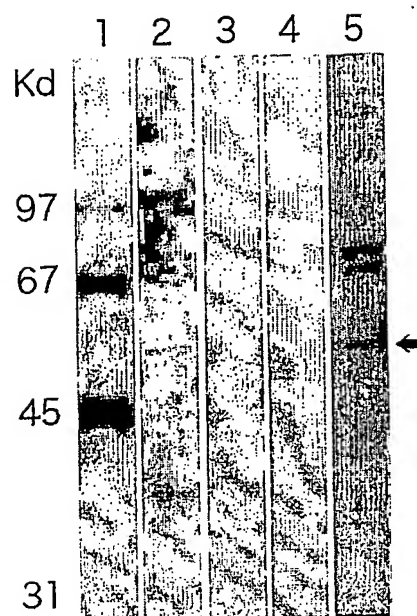


Fig. 2 A

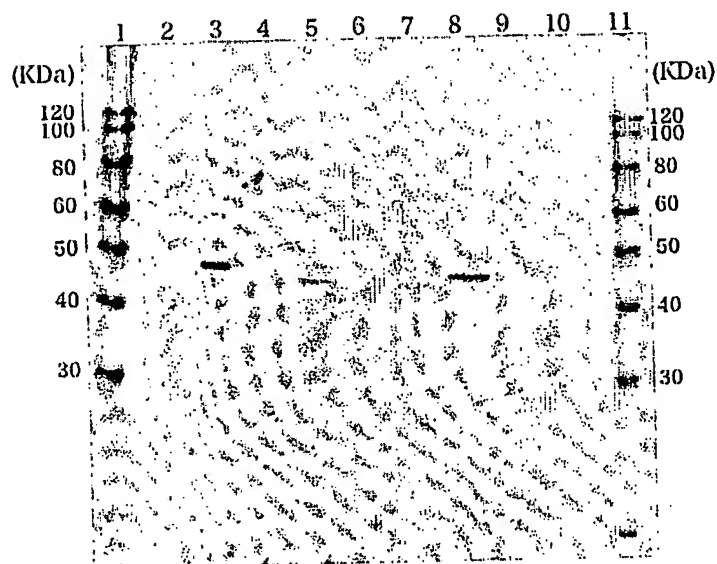


Fig. 2 B

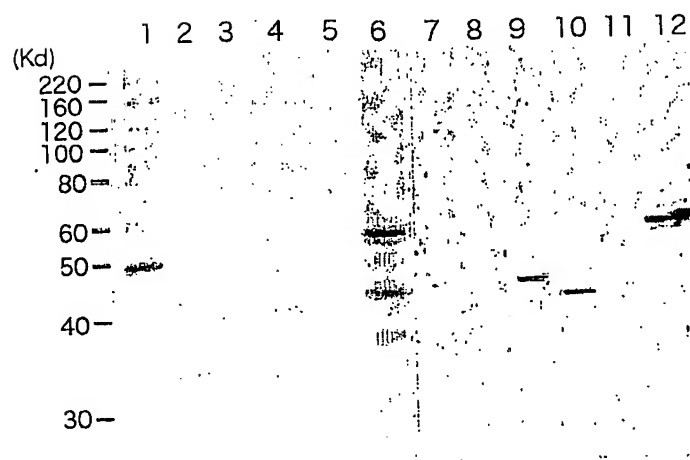
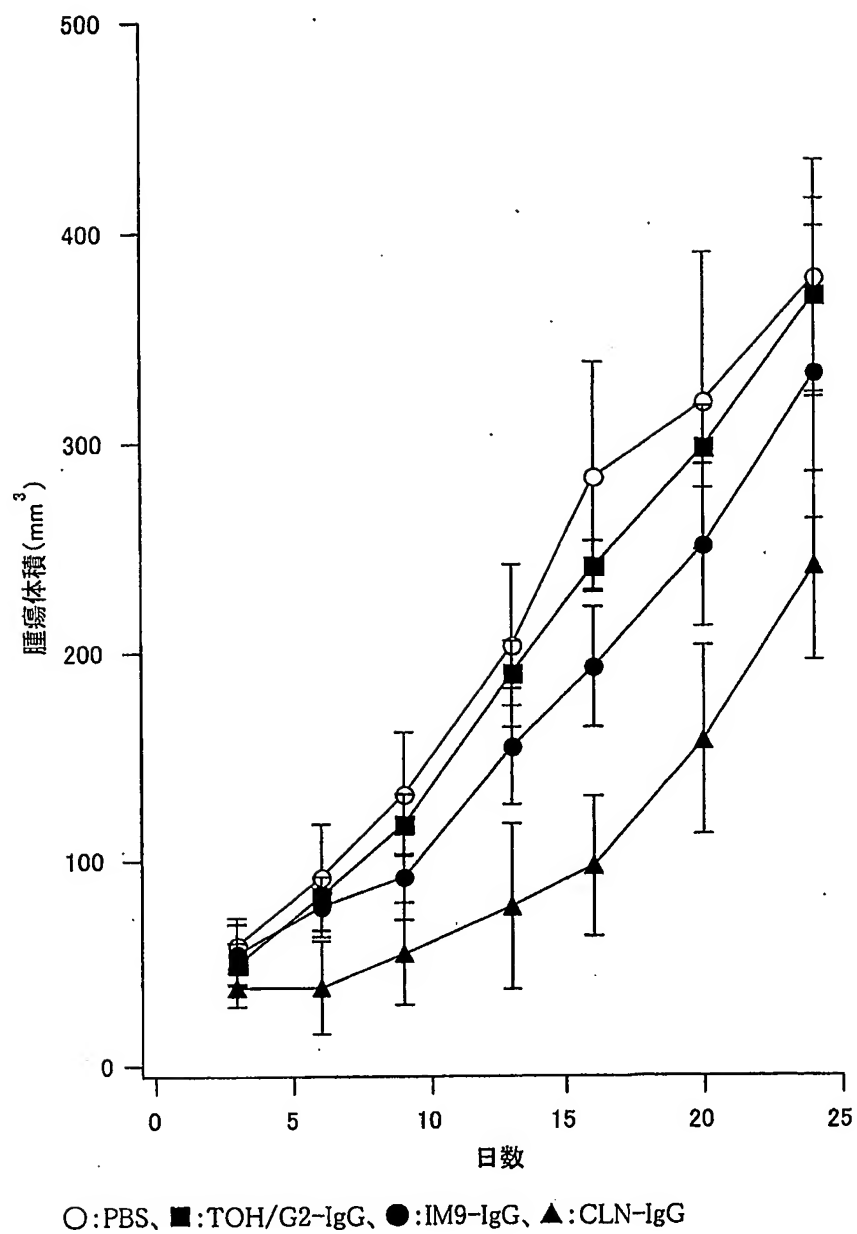


Fig. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14697

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE/CA/BIOSIS/WPIDS (STN), (CLN-IgG, HT2-IgM, human monoclonal antibody?*human vimentin?), SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{Y}$	HAGIWARA, H. et al., "Determination of the antigen/epitope that is recognized by human monoclonal antibody CLN-IgG", Human Antibodies, (2001), Vol.10, No.2, pages 77 to 82; Fig. 4	$\frac{1-3}{4,5}$
$\frac{X}{Y}$	JP 2002-51785 A (Yoshihide HAGIWARA), 19 February, 2002 (19.02.02), Full text; Figs. 1 to 12 (Family: none)	$\frac{1-3}{4,5}$
Y	KOKUNAI, T. et al., "Antigen related to cell proliferation in malignant gliomas recognized by a monoclonal antibody", J.Neurosurg, (1990), Vol.73, No.6, pages 901 to 908; Fig. 7; table 2	4,5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 January, 2004 (06.01.04)

Date of mailing of the international search report
20 January, 2004 (20.01.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14697

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Catgory*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OSUMI, K. et al., "Antibody dependent cell mediated cytotoxicity on human cervical carcinoma cell line, ME-180, with human monoclonal antibody", Cancer Letters, (1992), Vol.62, No.2, pages 179 to 183; Fig. 1	4, 5
Y	YAMASHITA, Y. et al., "Experimental study on immunotherapy of meningeal gliomatosis with monoclonal antibody", No To Shinkei. Brain and Nerve, (1993), Vol.45, No.1, pages 63 to 70; Figs. 1, 9	4, 5
Y	AOTSUKA, Y. and HAGIWARA, H., "Identification of a Malignant Cell Associated Antigen Recognized by a Human Monoclonal Antibody", Eur.J.Cancer Clin.Oncol, (1988), Vol.24, No.5, pages 829 to 838; Fig. 3	4, 5
X	Andre-Schwartz, J. et al., "Binding of Cytoskeletal Proteins by Monoclonal Anti-DNA Lupus Antibodies", Clinical Immunology and Immunopathology, (1984), Vol.31, No.2, pages 261 to 271; Figs. 7, 8	2
X	Ationu, A. and Collins, A., "Molecular Cloning and Expression of 56-58KD Antigen Associated with Transplant Coronary Artery Disease", Biochemical Biophysical Research Communication, (1997), Vol.236, No.3, pages 716 to 718; Figs. 1, 2	2
A	WO 02/12331 A2 (CORIXA CORP.), 14 February, 2002 (14.02.02), Full text; table 6 & AU 9622401 A	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14697

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 6

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 6 relates to a method of inhibiting cancer cell proliferation which pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. CI⁷ C07K16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. CI⁷ C07K16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE/CA/BIOSIS/WPIDS (STN), (CLN-IgG, HT2-IgM, human monoclonal antibody?*human vimentin?)
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X - Y	Hagiwara, H, et al, "Determination of the antigen/epitope that is recognized by human monoclonal antibody CLN-IgG", Human Antibodies, (2001), Vol. 10, No. 2, pp. 77-82, Fig. 4 参照	1-3 ----- 4, 5
X - Y	JP 2002-51785 A (萩原 義秀), 2002. 02. 19, 全文, 第1-12図参照 (ファミリーなし)	1-3 ----- 4, 5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 01. 2004

国際調査報告の発送日

20. 1. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊



4 B

3 3 3 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Kokunai, T, et al, "Antigen related to cell proliferation in malignant gliomas recognized by a monoclonal antibody", J. Neurosurg, (1990), Vol. 73, No. 6, pp. 901-908, Fig. 7, Table 2 参照	4, 5
Y	Osumi, K, et al, "Antibody dependent cell mediated cytotoxicity on human cervical carcinoma cell line, ME-180, with human monoclonal antibody", Cancer Letters, (1992), Vol. 62, No. 2, pp. 179-183, Fig. 1 参照	4, 5
Y	Yamashita, Y, et al, "Experimental study on immunotherapy of meningeal gliomatosis with monoclonal antibody", No To Shinkei. Brain and Nerve, (1993), Vol. 45, No. 1, pp. 63-70, Fig. 1, 9 参照	4, 5
Y	Aotsuka, Y and Hagiwara, H, "Identification of a Malignant Cell Associated Antigen Recognized by a Human Monoclonal Antibody", Eur J Cancer Clin Oncol, (1988), Vol. 24, No. 5, pp. 829-838, Fig. 3 参照	4, 5
X	Andre-Schwartz, J, et al, "Binding of Cytoskeletal Proteins by Monoclonal Anti-DNA Lupus Antibodies", Clinical Immunology and Immunopathology, (1984), Vol. 31, No. 2, pp. 261-271, Fig. 7, 8 参照	2
X	Ationu, A and Collins, A, "Molecular Cloning and Expression of 56-58KD Antigen Associated with Transplant Coronary Artery Disease", Biochemical Biophysical Research Communication, (1997), Vol. 236, No. 3, pp. 716-718, Fig. 1, 2 参照	2
A	WO 02/12331 A2 (CORIXA CORPORATION), 2002.02.14, 全文, Table. 6 参照 & AU 9622401 A	1-5

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲6は、癌細胞の増殖抑制方法であり、治療による人体の処置方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

SEQUENCE LISTING

<110> HAGIWARA Yoshihide

<120> 癌細胞増殖抑制ヒトモノクローナル抗体の取得法

<130> K-27Hagi

<150> JP2002/335281

<151> 2002-11-19

<160> 4

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒトビメンチンの配列を参考にして合成

<400> 1

tagcggccgc attctgaatc tcat

24

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒトビメンチンの配列を参考にして合成

<400> 2

gcggccgcat cctgcaggcg gccaat

26

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒトビメンチンの配列を参考にして合成

<400> 3

tagcgccgc catattctga atctc

25

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒトビメンチンの配列を参考にして合成

<400> 4

ccagaattcc aggctcagat tcag

24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒトビメンチンの配列を参考にして合成

<400> 5

cgggaattcg aatggtacaa atcc

24

<210> 6

<211> 127

<212> PRT

<213> human

<220>

<223>

<400> 6

Gln	Ala	Gln	Ile	Gln	Glu	Gln	His	Val	Gln	Ile	Asp	Val	Asp	Val	Ser
1				5					10					15	
Lys	Pro	Asp	Leu	Thr	Ala	Ala	Leu	Arg	Asp	Val	Arg	Gln	Gln	Tyr	Glu
			20					25						30	
Ser	Val	Ala	Ala	Lys	Asn	Leu	Gln	Glu	Ala	Glu	Glu	Trp	Tyr	Lys	Ser
			35				40						45		
Lys	Phe	Ala	Asp	Leu	Ser	Glu	Ala	Ala	Asn	Arg	Asn	Asn	Asp	Ala	Leu
			50				55						60		
Arg	Gln	Ala	Lys	Gln	Glu	Ser	Thr	Glu	Tyr	Arg	Arg	Gln	Val	Gln	Ser
			65				70					75			80
Leu	Thr	Cys	Glu	Val	Asp	Ala	Leu	Lys	Gly	Thr	Asn	Glu	Ser	Leu	Glu
							85					90			95

Arg Gln Met Arg Glu Met Glu Glu Asn Phe Ala Val Glu Ala Ala Asn

100

105

110

Tyr Gln Asp Thr Ile Gly Arg Leu Gln Asp Glu Ile Gln Asn Met

115

120

125

SEQUENCE LISTING

<110> HAGIWARA Yoshihide

<120> 癌細胞増殖抑制ヒトモノクローナル抗体の取得法

<130> K-27Hagi

<150> JP2002/335281

<151> 2002-11-19

<160> 4

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒトビメンチンの配列を参考にして合成

<400> 1

tagcggcgc attctgaatc tcat

24

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒトビメンチンの配列を参考にして合成

<400> 2

gcggccgcat cctgcaggcg gccaat

26

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒトビメンチンの配列を参考にして合成

<400> 3

tagcgccgc catattctga atctc

25

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒトビメンチンの配列を参考にして合成

<400> 4

ccagaattcc aggctcagat tcag

24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒトビメンチンの配列を参考にして合成

<400> 5

cgggaattcg aatggtacaa atcc

24

<210> 6

<211> 127

<212> PRT

<213> human

<220>

<223>

<400> 6

Gln Ala Gln Ile Gln Glu Gln His Val Gln Ile Asp Val Asp Val Ser

1 5 10 15

Lys Pro Asp Leu Thr Ala Ala Leu Arg Asp Val Arg Gln Gln Tyr Glu

20 25 30

Ser Val Ala Ala Lys Asn Leu Gln Glu Ala Glu Glu Trp Tyr Lys Ser

35 40 45

Lys Phe Ala Asp Leu Ser Glu Ala Ala Asn Arg Asn Asn Asp Ala Leu

50 55 60

Arg Gln Ala Lys Gln Glu Ser Thr Glu Tyr Arg Arg Gln Val Gln Ser

65 70 75 80

Leu Thr Cys Glu Val Asp Ala Leu Lys Gly Thr Asn Glu Ser Leu Glu

85 90 95

Arg Gln Met Arg Glu Met Glu Glu Asn Phe Ala Val Glu Ala Ala Asn

100

105

110

Tyr Gln Asp Thr Ile Gly Arg Leu Gln Asp Glu Ile Gln Asn Met

115

120

125